



Rapport de stage en entreprise

Etude de la régénération du sapelli (*Entandrophragma cylindricum* SPRAGUE) :
Impact de l'exploitation

Présenté par Alice Guyot & Gary Crouzet

Maître de stage : M.H. Chevallier
Enseignant responsable : D. Barloy

été 2001

Sommaire

<i>Introduction</i>	1
<u>PRESENTATION</u>	
I - Lieu d'étude	2
1 - LE CIRAD	2
2 - LE CIRAD-FORÊT	2
II - L'espèce étudiée : le sapelli	2
1 - DESCRIPTION	2
2 - EXPLOITATION	4
3 - LA FORÊT CAMEROUNAISE	4
A - La forêt de Dimako	4
B - La forêt de Ndama	5
III - L'objet de l'étude	6
<u>MATERIELS ET METHODES</u>	
I - Matériel	8
1 - MATÉRIEL VÉGÉTAL	8
2 - OUTILS MOLÉCULAIRES	8
II - Méthodes	8
1 - VÉRIFICATION ET DOSAGE DE L'ADN	8
2 - MIGRATION	9
3 - ANALYSE DES DONNÉES	9
A - Estimation de la diversité génétique	9
B - Structuration de la diversité génétique	9
C - Structuration spatiale de la diversité génétique	10
D - Recherche de paternité	10
<u>RESULTATS ET DISCUSSION</u>	
I - Résultats	11
1 - FRÉQUENCES ALLÉLIQUES	11
A - Chez les jeunes adultes	11
B - Chez les régénérations	12
2 - HÉTÉROZYGOTIE	13
3 - STRUCTURATION GÉNÉTIQUE	14
4 - CORRÉLATION SPATIALE DE LA DIVERSITÉ GÉNÉTIQUE	14
5 - RECHERCHE DE PATERNITÉ PAR EXCLUSION	15
II - Discussion	16
1 - RECHERCHE DE PATERNITÉ	16
A - Distances de pollinisation moyennes	16
B - Diamètre des arbres reproducteurs	18
2 - DIVERSITÉ GÉNÉTIQUE	19
<i>Conclusion</i>	22
<i>Bibliographie</i>	23
ANNEXES	26

Introduction

Le but de l'étude qui suit est de voir quel peut être l'influence de l'exploitation sur la régénération naturelle d'une méliacée au Cameroun, le sapelli (*Entandrophragma cylindricum* Spargue).

Les forêts africaines constituent un immense réservoir de diversité et jouent un rôle fondamental dans la satisfaction de nombreux besoins de base des populations locales. Elles contribuent à assurer la sécurité alimentaire et une meilleure couverture des besoins nutritionnels, en particulier des groupes sociaux les plus vulnérables. Cependant, ce réservoir de ressources génétiques forestières est menacé par une série de facteurs humains et naturels (défrichement, feux, surpâturage, exploitation, sécheresse) dont les effets restreignent le champ de possibilité des générations d'usagers actuelles et futures (Engels, 1998).

Les préoccupations concernant le déclin des forêts tropicales exprimées à l'échelle de la planète n'ont pas encore été traduites en action. Bien que la conservation, la gestion et l'utilisation durables des forêts tropicales figurent parmi les plus hautes priorités, les connaissances concernant l'impact des activités humaines sur la diversité génétique et les stratégies appropriées à développer pour la conservation, la production et l'amélioration des espèces ligneuses restent limitées et freinent les activités au niveau national et régional.

Un large éventail de marqueurs moléculaires est actuellement à la disposition du chercheur qui s'intéresse à la caractérisation et à l'utilisation des ressources génétiques forestières. Le marqueur moléculaire est défini, au sens génétique du terme, comme un locus dont le génotype renseigne sur le génotype d'un ou plusieurs locus voisins. Lorsqu'il est directement lié à l'ADN, c'est un marqueur moléculaire. La présente étude utilise les microsatellites, qui présentent un polymorphisme du nombre d'unité de répétitions. Les microsatellites ou SSR (Single Sequence Repeats) sont des répétitions en tandem de motifs mono-, di-, tri- ou tétranucléotidiques. Les plus courants sont $(A)_n$, $(TC)_n$, $(TAT)_n$, $(GATA)_n$, n pouvant atteindre plusieurs dizaines de nucléotides. En plus d'être très variables, les microsatellites sont bien répartis sur l'ensemble du génome (Chevallier, 1998).

Les microsatellites semblent avoir les qualités attendues de bons marqueurs en génétique des populations : transmission mendélienne, codominance, important polymorphisme, et, en première approximation, neutralité.

Nous proposons d'aborder cette question en nous focalisant sur le sapelli (*Entandrophragma cylindricum*). Il s'agit d'une espèce caractéristique des forêts denses humides semi-décidues de la région guinéo-congolaise, qui fournit un bois rouge de haute qualité technologique et de grande valeur économique : elle a représenté 11% du volume de bois exporté par le Cameroun en 1998 (2^{ème} rang derrière l'Ayous, *Triplochiton scleroxylon*) et figure en tête des espèces recherchées dans toute la cuvette congolaise, particulièrement dans les régions très éloignées des ports comme c'est le cas en Centrafrique.

Präsentation

I - Lieu d'étude

1 - LE CIRAD



Le centre de Coopération International en Recherche Agronomique pour le Développement (CIRAD) est un organisme scientifique, semi-public, spécialisé en agriculture et en agro-foresterie des régions tropicales et subtropicales. Il est né en 1984 de la fusion d'instituts de recherche en sciences agronomiques, vétérinaires, forestières, et agroalimentaires. Son objectif est de participer au développement de ces régions chaudes à travers la recherche, des réalisations expérimentales, la formation et l'information scientifique et technique. Il emploie 1800 personnes avec un budget annuel de 1 milliard de francs (152 millions d'euros) dont plus de la moitié provient de fonds publics.

Il est divisé depuis 1998 en 7 départements de recherche : cultures annuelles (CIRAD-ca); cultures pérennes (CIRAD-cp); productions fruitières et horticoles (CIRAD-flhor); élevage et médecine vétérinaire (CIRAD-emvt); forêts (CIRAD-forêt); territoires, environnement et acteurs (CIRAD-tera) et amélioration des méthodes pour l'innovation scientifique (CIRAD-amis).

Cet organisme se met à disposition des décideurs, états, collectivités locales ou associations de producteurs, travaille avec les structures nationales de recherche agronomique et soutient des opérations de développement. Il dispose de chercheurs dans une cinquantaine de pays et sa coopération internationale se réalise dans plus de 90 pays d'Afrique, d'Asie, du Pacifique, d'Amérique Latine et d'Europe (Le CIRAD en 1999, CIRAD, mai 2000, 96 p.).

2 - LE CIRAD-FORET

Notre stage a eu lieu dans le laboratoire de génétique forestière du CIRAD-forêt sur le site de Baillarguet à Montferrier sur Lez (34). Le département forêt du CIRAD a pour objectif d'analyser à travers différents modes de gestion des forêts, les retombées positives ou négatives dans leur réalité économique, sociale mais aussi environnementale et leurs conséquences sur l'écosystème forestier. Il étudie également la diversité au sein des essences exploitées et constitue une aide à la gestion et à l'amélioration des espèces sylvicoles.

Le CIRAD-forêt est composé de trois programmes :

- Arbres et plantations qui privilégie les enjeux économiques et environnementaux liés aux plantations forestières, villageoises comme industrielles,
- Bois qui s'occupe de la transformation, c'est-à-dire du choix rationnel du matériau et de l'optimisation du rendement le long de la chaîne de transformation,
- Forêts naturelles qui travaille sur des outils institutionnels et réglementaires de gestion et aussi sur la connaissance des écosystèmes forestiers.

Il représente 146 personnes, en France et à l'étranger, répartis dans les différents programmes. Le laboratoire où a eu lieu le stage est commun aux programmes Arbres et plantations et Forêts naturelles. C'est dans ce dernier que s'inscrit l'étude sur le sapelli que nous avons réalisée.

II - L'espèce étudiée : le sapelli

1 - DESCRIPTION

Le sapelli, *Entandrophragma cylindricum* (Sprague) Sprague, (du grec 'en' : dans "andros" : homme et 'phragma' : cloison, faisant référence au tube staminal cloisonné à la base et

'cylindricum' pour le tronc cylindrique) est une espèce forestière tropicale de la famille des Méliacées. La synonymie importante rencontrée comme : *Pseudocedrela cylindrica* Sprague, *E. rafa*, A. Chevalier., *E. tomentosum* A. Chevalier., *E. pseudocylindricum* Vermoesen, *E. lebrunii* Staner serait due aux larges variations intra-spécifiques qui existent au sein du genre *Entandrophragma* (Voorhoeve, 1965). Différents noms vernaculaires décrivent cette espèce en fonction des régions, par exemple aboudikro en Côte d'Ivoire. Le nom sapelli serait quant à lui issu de "Sapele", port fluvial au sud du Nigeria et constituant dès 1925 un centre commercial de bois et une zone de sciage du sapelli importants (The New Encyclopedie Britannica, 1981, VIII. USA, p. 891; in Mbarga A. Manga, 2000).

Cet arbre est réparti en Afrique, de la Côte d'Ivoire au Cameroun et à l'Est du Zaïre jusqu'en Ouganda près du Lac Victoria.

Il se rencontre dans la zone de transition entre forêts denses humides sempervirentes et semi-décidues (Aubréville, 1959) jusqu'aux limites de la savane ou de la forêt claire (sans nom, 1974). C'est un arbre disséminé non-pionnier, de demi-ombre pour les jeunes pousses puis héliophile lors de sa croissance. Essence monoïque, elle est généralement mature au-delà de 60 cm de diamètre (Dubois, 1998). La pollinisation serait entomophile et la dispersion des graines anémochore (graines ailées) (Voorhoeve, 1965), secondairement zoochore (insectes, rongeurs...) mais ceci reste à démontrer.

Cet arbre au feuillage clairsemé, porté à la base par des contreforts, dépasse les 30 mètres de haut pour un diamètre atteignant les 2 mètres 50 au maximum. Ces feuilles sont composées-pennées, caduques en saison sèche. L'inflorescence forme d'amples panicules groupées au sommet des rameaux et le fruit est une capsule fusiforme de 10 à 22 cm de long (figure 1) (Staner & Gilbert, 1958; sans nom, 1974).

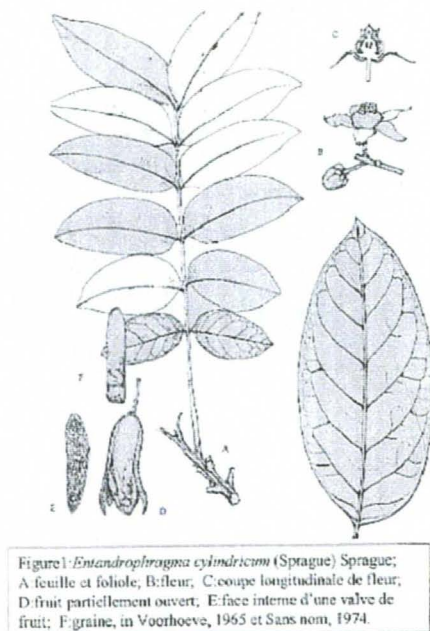


Figure 1 : Biologie du sapelli

Figure 2 : sapelli dans la forêt de Dimako

2 - EXPLOITATION

L'exploitation forestière daterait du 17^{ème} siècle et les espèces du genre *Entandrophragma* furent importées en Europe à cette période. Les principales exportations de bois africains proviennent d'Afrique occidentale et centrale et longtemps le sapelli comme le sipo (*E. utile* Sprague) ou l'acajou (*Khaya ivorensis* Chevalier) furent privilégiés comme bois d'œuvre pour l'esthétique et la facilité du travail.

Ainsi, cette méliacée africaine fait partie des essences à bois coloré d'intérêt commercial. De plus, elle semble être plus abondante que d'autres espèces comme le tiamia (*Entandrophragma angolense* (Welw.) De Candolle), le sipo ou l'acajou, si nous considérons sa large aire de répartition autour du bassin guinéo-congolais (sans nom, 1974). Le sapelli est utilisé comme bois massif ou de placage en ébénisterie et en menuiserie.

Au Cameroun, où le diamètre minimum d'exploitabilité est fixé à 100 cm, il représentait, par exemple, avec l'ayous (*Triplochiton scleroxylon* K. Schumann) près de 50% des grumes exportées (Karsenty, 1999). Aujourd'hui, l'exportation des grumes de sapelli est interdite ce qui a pour but de favoriser l'industrie de sciage camerounaise.

En février 2000, le prix des grumes et des sciages de sapelli sur le marché camerounais étaient respectivement de 145.000 frs CFA/m³ et 275.000 frs CFA/m³ (Mbarga A. Manga, 2000) soit 1450 frs fr. et 2750 frs fr.. Déjà en 1974, au Nigeria qui était bien positionné sur le marché, il a été la deuxième essence exportée avec plus de 36000 m³ (Bois et Forêts des Tropiques, 1977). Entre 1997-1998, un volume de 200000 m³ de grumes a été exporté du Cameroun.

L'exploitation se fait de diverses manières soit par des opérations d'éclaircie, soit par la constitution de réseaux de pistes de débardage sélectifs pour les espèces dispersées. Cependant les régions les plus convoitées restent celles des zones côtières plus proches des centres d'exportations ou des axes routiers (IUCN, 1996).

A bien plus petite échelle, la forêt fournit localement une source alimentaire et médicinale importante. Les fruits et les écorces constituent à cet égard des produits essentiels. L'écorce du sapelli ainsi que certaines espèces de chenilles qui s'y développent sont utilisées comme médicaments et aliments (Forni, 1995; Projet API-Dimako, 1995a et b).

3 - LA FORET CAMEROUNAISE

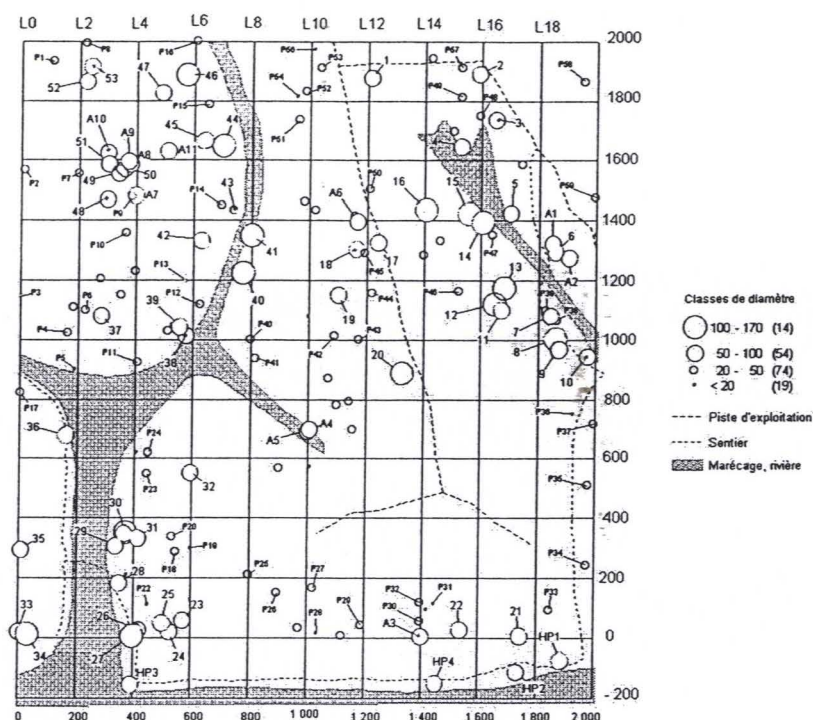
Les échantillons à partir desquels nous avons travaillé, proviennent de deux sites au sud-est du Cameroun (annexe I). Ces forêts, retenues pour l'étude, ont donné lieu à l'élaboration de plusieurs plans d'aménagement forestier (API : Aménagement Pilote Intégré de Dimako) (Fomi, 1995; Projet API-Dimako, 1995a; Durrieu de Madron & Forni, 1997), devant être réalisés dans les années à venir. A ceci, est associé le projet "Forêts et Terroirs" géré par le CIRAD-Forêt, en collaboration avec entre autres le MINEF (Ministère des eaux et forêts, Cameroun) et l'ONF (Office National des Forêts, France). Ces projets concernent les modes d'appropriation et d'exploitation en zone forestière. Ils ont pour objectif de trouver des issues positives, en terme de droit foncier et de concilier le droit moderne et les droits coutumiers (Karsenty, 2000) dans un souci de gestion durable de la forêt.

Les deux parcelles se situent à environ 150 km, mais dans des lieux similaires pour le climat (équatorial guinéen).

A - La forêt de Dimako

La première forêt est située dans la province de l'Est, dans le département de la Kadey au sud de Dimako. Dans cette zone, les pratiques humaines ne sont pas à négliger avec la présence de

localités ou de cantons comme Doumé et les activités liées à celles-ci : cueillettes, chasse, agriculture, pêche et élevage (Forni, 1995; Projet API-Dimako, 1995a).



Carte 1 : Parcelle de Dimako (d'après N. Fauvet, 2000)

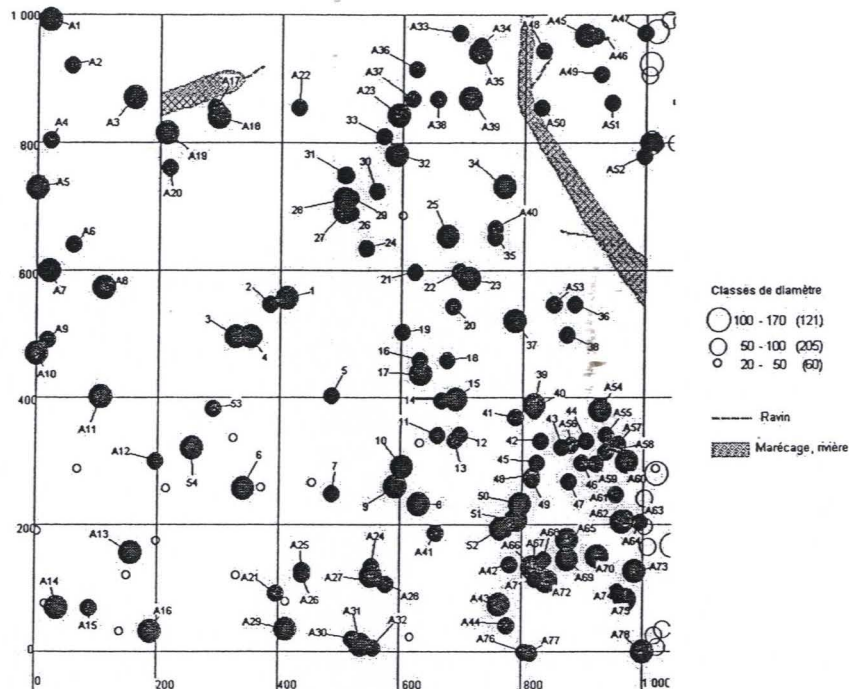
La parcelle échantillonnée, de 400 hectares, est en forêt semi-caducifoliée à Sterculiacées et Ulmacées (Letouzey, 1968) où le sapelli est l'une des espèces arborescentes les plus fréquentes. Cette forêt a été exploitée entre 1958 et 1974 et la densité actuelle des arbres de notre espèce sur la parcelle est de 0,463 individus par hectare en général et de 0,35 individus de plus de 20 cm de diamètre par ha. Malgré l'exploitation et l'absence d'arbres de grands diamètres, le sapelli présente une régénération importante. Nous pouvons supposer qu'elle est due en partie aux trouées occasionnées par les abattages et favorisant les jeunes pousses.

B - La forêt de Ndama

Le deuxième site se trouve à 150 km au sud-est du premier, à l'ouest de la rivière Ndama et au sud d'une région fortement exploitée jusqu'en 1994. Elle fait partie d'une unité forestière aménagée (U. F. A.) 10-038. Le sapelli représente 27% du nombre totale de tiges d'essences commerciales, ce qui le place en quatrième position si on considère les tiges exploitables (diamètre supérieur au diamètre minimum d'exploitation). Les activités humaines sont essentiellement représentées par des campements temporaires de pygmées ou de chasseurs (Projet API-Dimako, 1995b).

Cette parcelle de 100 hectares est située en forêt de transition entre la forêt semi-décidue et la forêt dense humide sempervirente à dominante semi-caducifoliée. La densité de sapellis est estimée à 1,46 individus par hectare. La structure diamétrique de la population présente une "bosse". Durrieu de Madron et Forni (1997) parlent de structure en cloche qui caractérise des espèces de lumière à tendance grégaire. Letouzey (1968) lie de telles structures à

des défrichements de grande échelle il y a environ 200 ans. Actuellement, les essences héliophiles ne pouvant plus se régénérer dans le sous-bois présentent un déficit parmi les classes de petits diamètres.



Carte 2 : Parcelle de Ndama (d'après N. Fauvet, 1999)

III - L'objet de l'étude

L'étude que nous avons réalisée porte sur les régénérations naturelles à Dimako et Ndama. Ce terme de régénération naturelle peut avoir plusieurs significations :

- dans le sens forestier, c'est une technique qui fait appel à l'ensemencement spontané en opposition aux techniques d'enrichissement ou de plantation. (Mbarga A. Manga, 2000)
- dans le sens écologique, c'est l'ensemble des processus dynamiques qui permettent de reconstituer un couvert qui a été entamé (Foggie, 1960; Alexandre, 1979; Alexandre, 1989; in Mbarga A. Manga, 2000).

Ici, nous prendrons le terme dans son sens forestier puisque ce sont les plantules récoltées sous un arbre adulte appelé semencier.

Ainsi, pour voir l'impact que peut avoir l'exploitation, nous avons eu à notre disposition des régénérations naturelles provenant de Dimako qui ont été récupérées sous le semencier 20. Ce dernier a été choisi en fonction de sa place centrale dans la parcelle. Sur la figure 3, nous pouvons voir la disposition de ces régénérations sous le semencier 20.

	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M	N	O	P	Q	R	S	T
1																				
2								X	X	X										
3										X			X					X		
4													X					X		
5			X							X			X							
6										X			X							
7						X					X	X				X				
8								X			X			X		X				
9				X							X			X	X	X	X			
10		X		X	X			X							X	X	X	X		
11				X	X			X			X	X		X						X
12							X						X	X	X				X	
13				X										X	X					
14								X							X	X				
15		X			X					X		X		X		X	X			
16	X						X		X	X		X		X	X	X				
17		X			X	X	X	X			X	X							X	
18			X							X						X				
19		X				X									X					
20										X	X			X						

X Régénérations

Semencier

Figure 3 : Plan du dispositif expérimental : régénérations sous le semencier 20

Nous avons également utilisé des régénérations provenant de Ndama, récoltées sous quatres semenciers différents (3, 4, 5, 54).

IL a donc été nécessaire de connaître le génotypes de tous les parents potentiels. Nous avons donc effectuer le génotypage des jeunes adultes, c'est-à-dire les arbres dont le diamètre se situe entre 20 et 50 cm, à Dimako puisqu'il n'en existe pas à Ndama. En ce qui concerne les adultes, leur génotype a été établi en 2000 par F. Garcia.

Matériel et méthodes

I - Matériel

1 - MATERIEL VEGETAL

Pour cette étude, nous avons utilisé du matériel foliaire issu d'individus échantillonnés en 2000/2001. Les feuilles de sapelli ont été ramassées au sol pour les jeunes adultes et sur les tiges pour les régénérations.

Nombres d'individus récoltés	Jeunes adultes	Régénérations
Dimako	44	86
Ndama	0	17

Tableau 1 : Individus récoltés sur les deux sites

L'extraction d'ADN a été effectuée selon deux méthodes, la méthode « cacao » (méthode simplifiée d'après J. Bousquet *et al.*) pour les jeunes adultes, et le mini kit Qiagen pour les régénérations (protocoles en annexes 2 et 3).

2 - OUTILS MOLECULAIRES

Nous nous sommes servis de trois couples d'amorces microsatellites parmi les dix développées sur le sapelli. Ces trois locus sont ceux révélant le maximum de polymorphisme.

Amorces	5' → 3' forward reverse	Taille (pb) Température (°C)	Séquences microsatellites
156	AAG CGA AGT AGA AAC CAA TA CAG AAG GAG AAG GAG GAG AG	176-210 54	(TC) ₁₇
244	CCA TAA AGC ATA CCA TCA TT GGG AGA AGG GAA GGA AGG	206-296 56	(TC) ₁₈ (TA) ₂ (TC)TTGAAAGAT T(TC) ₂₈
271	TCT CCC TCT GTT ATC ATT TGA A TGG CAA TGG ATC GTC GGT	114-167 56	(TC) ₃ CC(TC) ₂₂

Tableau 2 : amorces et séquences microsatellites utilisées, spécifiques à l'espèce *Entandrophragma cylindricum*

II - Méthodes

1 - VERIFICATION ET DOSAGE DE L'ADN

L'intégrité de l'ADN extrait a été vérifiée par migration sur gel d'agarose 1% (annexe 4), et la concentration déterminée grâce à la migration conjointe d'une gamme étalon d'ADN de phage λ

de 25 à 300 ng/μl. Après migration, les gels sont révélés au bromure d'éthidium, qui s'intercale entre les bases d'ADN, et photographiés sous ultra violets.

Une dilution des solutions mères à 5 ng/μl a ensuite été effectuée, ainsi qu'une seconde migration sur gel d'agarose 1% pour vérification.

2 - MIGRATION

Après des PCR (annexe 5) aux températures d'hybridation définies dans le tableau 1, la pureté des fragments amplifiés est vérifiée par migration sur mini gel d'agarose 3% (annexe 4), ainsi que la taille des fragments grâce à des témoins (Gene ruler ladder mix 1000 pb FERMENTAS).

Les fragments amplifiés sont dénaturés à 94°C pendant 3 minutes et plongés dans la glace pour éviter la ré-association des brins d'ADN. Les dépôts sont faits et les migrations sont effectuées pendant au moins trois heures sur des grands gels dénaturants d'acrylamide 6%. Trois gels sont nécessaires par amorce pour passer tous les individus, soit 147 dépôts par amorce. A cela, nous ajoutons de chaque côté et au milieu des échantillons une échelle (Lambda 10 pb, Gibco). Les révélations des gels d'acrylamide sont effectuées au nitrate d'argent (annexe 6).

3 - ANALYSE DES DONNEES

A - Estimation de la diversité génétique

Dans un premier temps, nous avons visualisé la diversité à travers l'hétérozygotie observée (H_{obs} = moyenne des fréquences des hétérozygotes par locus dans la population) et l'hétérozygotie attendue (H_{att} = fréquence d'apparition d'hétérozygotes dans la population sous l'hypothèse de Hardy-Weinberg) au sein de chaque population avec le logiciel Popgene version 1.32 (Yeh F.C., Yang R.C., Boyle T. B. J., Ye Z-H, Mao J. X., Popgene, the user-friendly shareware for population genetic analysis, Centre for International Forestry Research, University of Alberta, Canada, version modifiée le 10 septembre 1999, <http://www.ualberta.ca>).

Les fréquences alléliques, rapport entre le nombre de copies de chaque allèle présent dans la population et le nombre total d'allèles du locus dans la population, ainsi que le nombre de génotypes différents par locus sont calculés.

B - Structuration de la diversité génétique

La divergence génétique entre les différents niveaux d'organisation a été analysée par l'estimation des indices de fixation de Wright (F_{is} , F_{st} et F_{it}). Ils ont été calculés à partir du logiciel Popgene version 1.32. Ils donnent une idée de l'écart à l'équilibre de Hardy-Weinberg au niveau observé.

F_{is} (coefficient de consanguinité) mesure la diminution de l'hétérozygotie d'un individu provoquée par un écart à la panmixie dans sa sous-population.

$$F_{is} = (H_s - H_i) / H_s$$

F_{st} (index de fixation) exprime la diminution de l'hétérozygotie d'une sous-population provoquée par la dérive génétique.

$$F_{st} = (H_t - H_s) / H_t$$

F_{it} (coefficient global de consanguinité d'un individu) mesure la réduction du taux d'hétérozygotie d'un individu par rapport à la population totale.

$$F_{it} = (H_t - H_i) / H_t$$

H_i : hétérozygotie d'un individu dans une sous-population.

H_s : hétérozygotie attendue d'un individu dans une sous-population équivalente en panmixie.

H_t : hétérozygotie attendue d'un individu dans une population totale équivalente en panmixie (Zongo, 1998).

C - Structuration spatiale de la diversité génétique

Dans l'hypothèse de peuplements continus, nous avons utilisé l'indice de Moran I . Celui-ci permet d'évaluer la structuration spatiale de la diversité génétique par classe de distance. Cet indice mesure la corrélation d'une variable donnée avec elle-même à la distance entre les arbres. Des classes de distance de 75 mètres sont définies pour qu'il y ait suffisamment d'individus dans chaque classe et les variables sont les numéros des allèles.

La formule de cet indice est :

$$I = \frac{n \sum_i \sum_j w_{ij}(d) \cdot (x_i - \bar{x}) \cdot (x_j - \bar{x})}{\left\{ \sum_i \sum_j w_{ij}(d) \right\} \left\{ \sum_i (x_i - \bar{x})^2 \right\}}$$

n : nombre d'arbres

x_i et x_j : valeurs des variables des arbres i et j

\bar{x} : valeur moyenne des x_i sur les n arbres

$w_{ij}(d)$: est égal à 1 si les arbres i et j sont séparés par une classe de distance d et égal à 0 si ce n'est pas le cas

Les valeurs globales de l'indice associées aux classes de distance d produisent un corrélogramme de fonction $I(d)$ (Hardy et Wekemans, 1999). Pour le calcul de cet indice nous avons utilisé Program AutocorG version 2.1 (Hardy O., Wekemans X., Université Libre de Bruxelles).

D - Recherche de paternité

Nous avons effectué l'analyse de recherche de paternité des 103 régénérations provenant des deux sites d'échantillonnage à partir du logiciel Cervus version 2.0 (Marshall T., University of Edinburgh, version modifiée en mai 2001, <http://helios.bto.ed.ac.uk/evolgen/cervus/cervus.html>), qui exploite les marqueurs codominants hautement polymorphes. Les semenciers sous lesquels les échantillons ont été récoltés sont considérés comme les parents connus, et le parent le plus probable a été déterminé parmi 236 parents candidats.

Ce logiciel tient compte du nombre de parents candidats, des fréquences alléliques de la population étudiée et des lacunes et erreurs des données génétiques pour déterminer les vraisemblances de parenté de chaque parent candidat. Les résultats sont donnés sous forme de LOD scores, ce qui correspond au logarithme base e du produit des rapports de vraisemblance à chaque locus. Un LOD score positif implique que le parent candidat a plus de probabilité d'être le vrai parent qu'un individu choisi au hasard. La différence entre les LOD scores du parent le plus probable et du second parent le plus probable permet le calcul de Delta, qui est comparé au Delta critique. Cette comparaison permet d'évaluer statistiquement le niveau de confiance du résultat, aux seuils de 95 ou 80%.

Résultats

et

discussion

I - Résultats

Comme nous l'avons vu, nous nous sommes intéressés à deux catégories d'arbres différentes : des régénérations provenant des deux parcelles et des "jeunes adultes" de Dimako. Ainsi, dans les résultats nous exposerons d'abord ce qui est commun à ces deux groupes et ensuite nous verrons chaque groupe séparément.

1 - FREQUENCES ALLELIQUES

A partir de la lecture des gels d'acrylamide, nous avons pu établir les génotypes de chaque individu et ainsi observer la diversité génétique au sein des trois groupes d'arbres.

Nous pouvons voir que les trois locus choisis présentent un polymorphisme important (tableaux 3a et 3b) puisque le nombre d'allèles est compris entre 17 et 29 avec une moyenne de 23,3 allèles par locus pour les régénérations et de 21,3 pour les "jeunes adultes".

Locus	Nombre d'allèles	Individus	(a)	(b)	Locus	Nombre d'allèles	Individus
156	17	100			156	19	36
244	29	103			244	25	42
271	24	102			271	20	42
Moyenne	23,3	101,7			Moyenne	21,3	40

Tableaux 3a et 3b : Nombre d'allèles par locus chez les régénérations (a) et chez les "jeunes adultes" (b)

On peut noter qu'en considérant les moyennes pondérées par le nombre d'individus le polymorphisme est plus élevé chez les jeunes adultes.

A - Chez les jeunes adultes

La plupart des fréquences alléliques (annexe 7) sont comprises entre 1 et 10%. Il n'existe qu'un seul allèle dont la fréquence est très élevée (25%). Par comparaison avec les adultes (F. Garcia, 2000), il y avait 26 allèles rares ($P < 1\%$) et 5 "majoritaires" ($P > 20\%$) dont l'allèle 118 au locus 271 identique aux jeunes adultes.

Le tableau 4 montre le nombre de génotypes différents expliqués par chaque locus et leur pourcentage par rapport à la population. Les locus les plus discriminants sont ceux qui traduisent une forte variabilité en nombre d'allèles.

Dimako Ja	individus	Allèles	génotypes	% ind. identifiés
Locus 156	36	19	24	66.7%
Locus 244	42	25	29	69.0%
Locus 271	42	20	25	59.5%

Tableau 4 : Allèles et génotypes révélés chez les jeunes adultes

Le locus qui permet de distinguer la plus grande partie des arbres est le locus 244 avec 25 allèles. Il permet de caractériser 69 % des individus. Le locus 156 est aussi assez discriminant mais il ne porte que sur 36 individus au lieu de 42.

Enfin, si on prend les locus par paire ou tous ensemble, on peut arriver à identifier un nombre plus important d'individus. On peut voir en fonction de chaque paire d'amorce le pourcentage d'individus identifiés (Tableau 5).

Paire d'amorces	Pourcentage d'individus identifiés
156-244	93,1 %
244-271	90,9 %
156-271	86,9 %
Les trois locus	95,4 %

Tableau 5 : Identification des individus par les amorces prises deux à deux.

On remarque logiquement, qu'on obtient le meilleur résultat avec les amorces 156 et 244 qui étaient déjà les plus discriminantes seules. Ainsi, il reste encore 2 groupes d'arbres non-identifiables. Néanmoins, sur ces deux groupes l'un est le couple P58-P59 qui sont deux arbres se trouvant assez proches l'un de l'autre, et l'autre groupe est constitué par les 6 arbres dont on ne connaît pas le génotype au locus 156. Par conséquent en supprimant ce dernier groupe, on arrive à un pourcentage de 97,2 %.

B - Chez les régénérations

a) Dimako

Le tableau en annexe 8 nous montre qu'il existe de nombreux allèles rares et en ce qui concerne les allèles majoritaires, on remarque qu'il en existe un voire deux par locus pour chaque population.

On remarque que le nombre d'individus identifiés grâce à un locus est assez faible : entre 40 et 49% (tableau 6).

Dimako Rég	individus	allèles	génotypes	% ind. identifiés
Locus 156	83	17	34	41.0%
Locus 244	86	28	42	48.8%
Locus 271	85	22	37	43.5%

Tableaux 6 : Allèles et génotypes révélés chez les régénérations de Dimako

En revanche, si on observe les combinaisons de locus deux à deux on obtient les résultats des tableaux ci-dessous.

Régénérations de Dimako	
Paire d'amorces	Pourcentage d'individus identifiés
156-244	97,7 %
244-271	97,7 %
156-271	94,2 %
Les trois locus	100 %

Tableau 7 : Identifications des individus par les amorces prises deux à deux

On observe que grâce aux trois locus, on peut identifier tous les individus ce qui sera très utile par la suite lors de la recherche de paternité.

b) Ndama

L'annexe 8 montre qu'il n'existe pas d'allèles rares. En revanche, il existe un ou deux allèles majoritaires comme à Dimako.

L'identification des individus par un seul locus donne des résultats assez bons puisque le nombre d'individus identifiés peut aller jusqu'à 88%.

Ndama Rég	individus	allèles	génotypes	% ind. identifiés
Locus 156	17	9	14	82.4%
244	17	12	15	88.2%
271	17	12	13	76.5%

Tableaux 8 : Allèles et génotypes révélés chez les régénérations de Ndama

Si on prend les locus par couple, on arrive à un pourcentage d'individus identifiés de 100%, donc c'est également le cas pour les trois locus ensemble.

2 - HETEROZYGOTIE

Le tableau 9 décrit l'hétérozygotie observée (H_{obs}). Celle-ci varie de 0,76 à 0,98 en fonction des locus considérés, avec une valeur moyenne de 0,86. La valeur de référence est H_{att} , l'hétérozygotie attendue pour une population en équilibre de Hardy-Weinberg.

Dans le cas des jeunes adultes provenant de la parcelle de Dimako, nous remarquons un déficit en hétérozygotes.

Au contraire, les régénérations de Dimako présentent un excès d'hétérozygotes par rapport au nombre d'hétérozygotes attendu dans le cadre d'une population qui évoluerait selon la loi de Hardy-Weinberg, pour les trois loci considérés.

A Ndama, où les régénérations proviennent de quatre semenciers différents, nous observons un léger déficit en hétérozygotes, excepté pour le locus 271.

Population	Jeunes adultes Dimako		Régénérations Dimako		Régénérations Ndama	
Locus	H_{obs}	H_{att}	H_{obs}	H_{att}	H_{obs}	H_{att}
156	0.81	0.93	0.87	0.83	0.82	0.85
244	0.76	0.94	0.86	0.85	0.82	0.91
271	0.98	0.90	0.87	0.82	0.94	0.87
Moyenne	0.85	0.92	0.87	0.83	0.86	0.88

Tableau 9 : Hétérozygotie dans chaque population

3 - STRUCTURATION GENETIQUE

Le coefficient de consanguinité traduit par le F_{is} montre un écart par rapport à la panmixie. En effet, les régénérations possèdent toutes un des allèles maternels et l'arbre choisi comme semencier a participé à chaque croisement, ces derniers ne s'effectuent donc pas au hasard et la condition de panmixie ne peut être réalisée.

L'index de fixation F_{st} indique quant à lui une divergence génétique entre les populations de régénérations de Ndama et Dimako. Il dénote ainsi des allèles fixés, ce qui est logique étant donné que les populations sont chacune constituées d'individus provenant des mêmes semenciers.

Le coefficient global de consanguinité, F_{it} , est relativement élevé, pour les mêmes raisons que précédemment.

Locus	F_{is}	F_{it}	F_{st}
156	-0.021	0.035	0.055
244	0.023	0.043	0.021
271	-0.092	-0.008	0.077
Moyenne	-0.029	0.024	0.051

Tableau 10 : Indices de fixation de Wright des populations de régénérations

4 - CORRELATION SPATIALE DE LA DIVERSITE GENETIQUE

Les résultats des auto-corrélations spatiales ont été obtenus pour les jeunes adultes de la parcelle de Dimako. La pertinence des valeurs a été calculée par un test de permutations avec 10 000 itérations. Ainsi, cet indice montre une proximité génétique des individus s'il est supérieur à zéro.

Les locus 244 et 271 ne présentent aucune corrélation significative ($P > 0.05$). On n'observe donc aucune corrélation si on prend tous les locus ensemble.

La figure 4 montre chez les jeunes adultes un apparentement génétique des individus pour le locus 156. Les valeurs de l'indice de Moran sont significatives pour les deux premières classes de distance, qui sont de 0-75 mètres et 75-150 mètres.

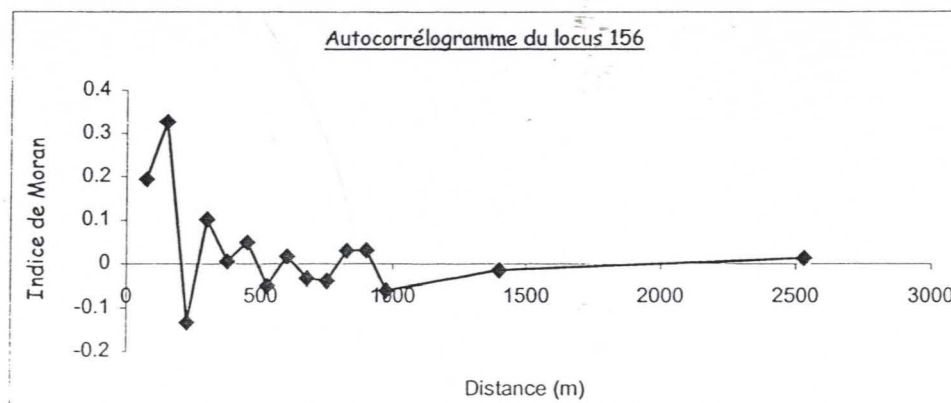


Figure 4 : Autocorrélogramme des jeunes adultes de Dimako pour le locus 156

5 - RECHERCHE DE PATERNITE PAR EXCLUSION

La pertinence des valeurs de recherche de paternité a été calculée par un test de permutations avec 10 000 itérations. Les parents candidats sont les individus d'un diamètre supérieur à 50 centimètres ainsi que les jeunes adultes pour la parcelle de Dimako. Le nombre d'individus candidats est variable selon les locus car les individus typés à moins de trois locus sont exclus de la recherche de paternité.

Le locus 244 est celui présentant le plus d'allèles, et est celui pour lequel les probabilités d'exclusion sont les plus élevées (tableau 11).

Les probabilités d'exclusion du premier parent sont inférieures à celles du deuxième parent. Le premier parent est le parent connu, c'est-à-dire le semencier sous lequel les régénérations ont été récoltées. Les valeurs montrent qu'environ un quart des graines ne proviendrait pas du semencier.

Les probabilités d'exclusion du deuxième parent varient entre 79 et 89%, ce qui est considéré comme significatif par le logiciel Cervus. En effet, ce dernier évalue statistiquement le niveau de confiance du résultat aux seuils de 95 ou 80%. De plus, si on observe la probabilité d'exclusion totale pour chaque population, elle varie entre 98% et plus de 99% ce qui est donc très significatif.

Site	Locus	Nombre		Taux d'informations polymorphes	Probabilité d'exclusion	
		d'allèles	D'individus		1er parent	2ème parent
Dimako	156	28	183	0,908	0,71	0,83
	244	44	192	0,933	0,78	0,87
	271	34	189	0,885	0,66	0,79
	Pouvoir d'exclusion total				0,977	0,99
Ndama	156	21	132	0,922	0,74	0,85
	244	33	136	0,942	0,80	0,89
	271	27	129	0,924	0,75	0,86
	Pouvoir d'exclusion total				0,986	0,997

Tableau 11 : Pertinence de la recherche de paternité

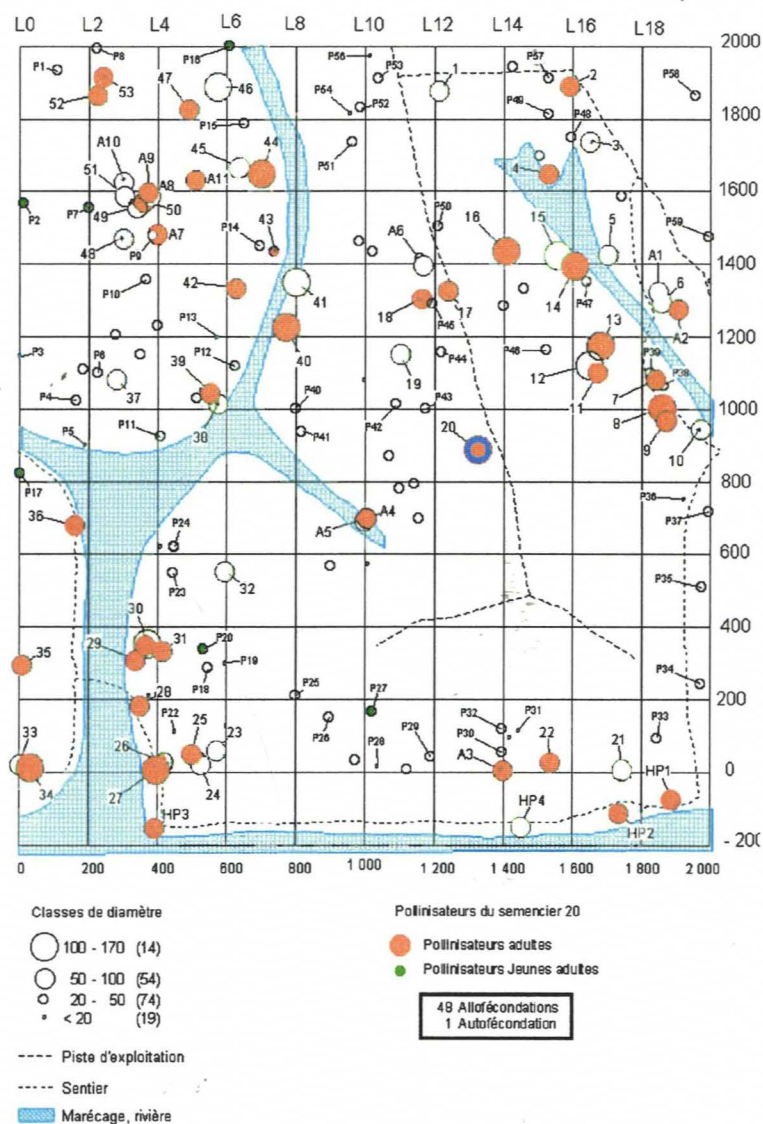
II - Discussion

Malgré un nombre de bandes attendues restreint, au maximum 2 par individu diploïde, la lecture des gels de séquence n'est pas facile. En effet, les bandes les plus intenses se confondent souvent parmi des parasites dues aux "glissements" ("slippage") de la polymérase lors de l'élongation. Elles induisent l'ajout ou le retrait de bases par rapport à la séquence à amplifier (Jarne et Lagoda, 1996). De plus, nous n'avons pas toujours mis de témoin, c'est-à-dire d'individus adultes génotypés en 2000 par Fabien Garcia, sur les gels. Ceci implique qu'il peut y avoir des dérives entre les adultes et les régénérations. Néanmoins, l'utilisation d'une échelle ainsi que la connaissance du semencier-parent permet de recueillir des données qu'on peut estimer fiables.

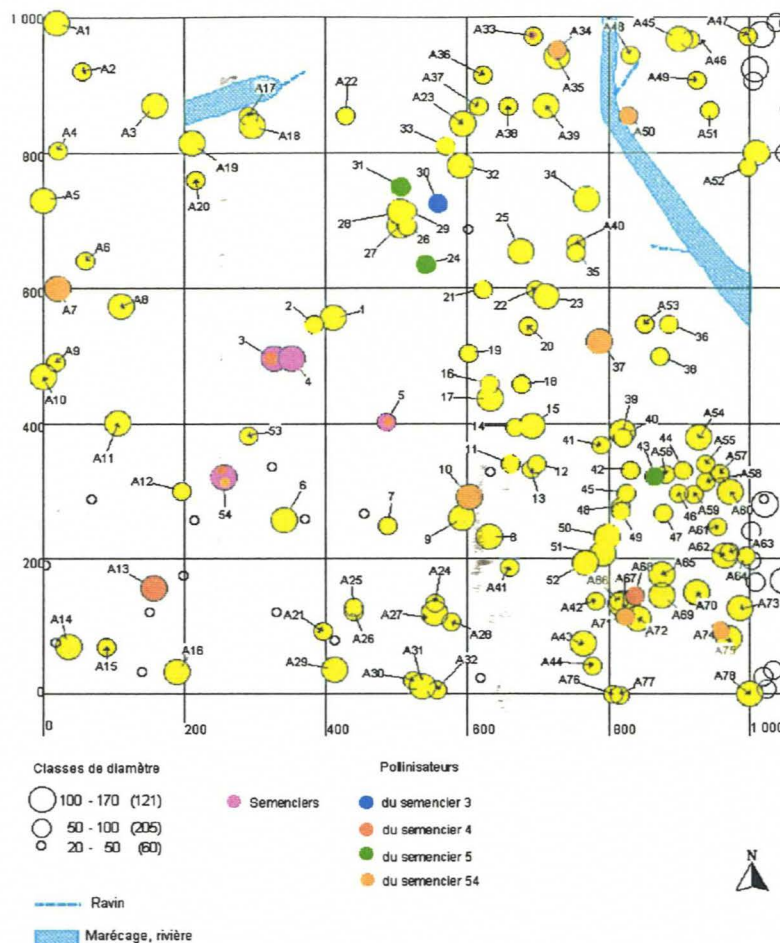
1 - RECHERCHE DE PATERNITE

A - Distances de pollinisation moyennes

Grâce aux cartes 3 et 4, on peut visualiser les pollinisateurs probables des semenciers à Ndama et Dimako.



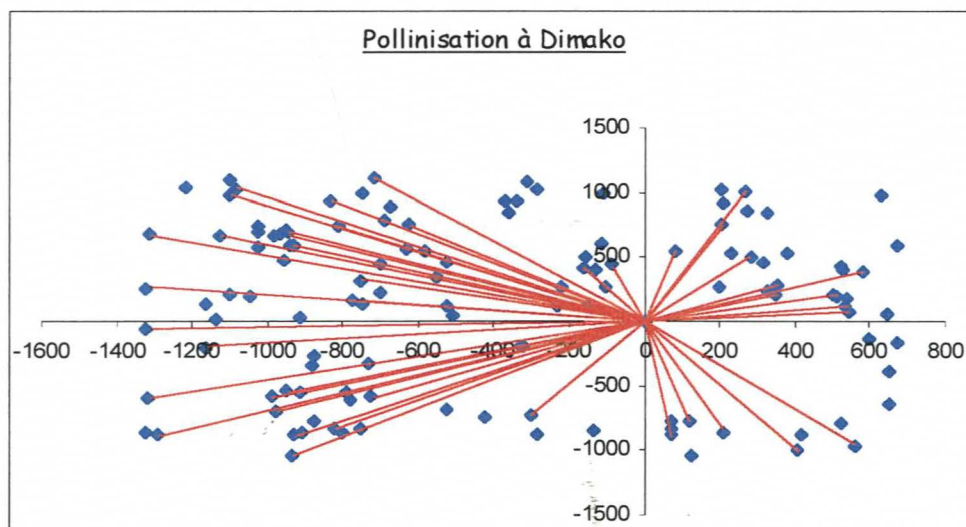
Carte 3 : Pollinisateurs du semencier 20 à Dimako (d'après N. Fauvet, 2000)



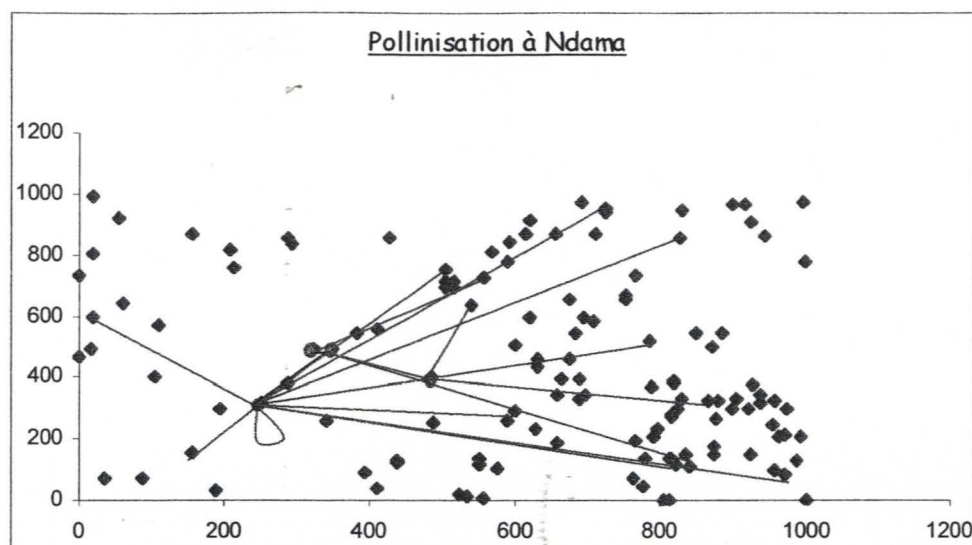
Carte 4 : Pollinisateurs des différents semencier à Ndama (d'après N. Fauvet, 2000)

Pour Dimako, nous trouvons une distance de 965 mètres et pour Ndama de 405 mètres. La distance de pollinisation moyenne est donc environ deux fois plus élevée à Dimako qu'à Ndama. Ceci est dû au fait qu'à Dimako les sapellis sont beaucoup plus éloignés les uns des autres (la densité est quatre fois plus élevée à Ndama). La parcelle échantillonnée à Ndama représente seulement 100 hectares, alors que celle de Dimako est de 400 hectares. Il est donc possible qu'à Ndama des individus situés hors-parcelle aient participé à la reproduction.

(5a)



(5b)



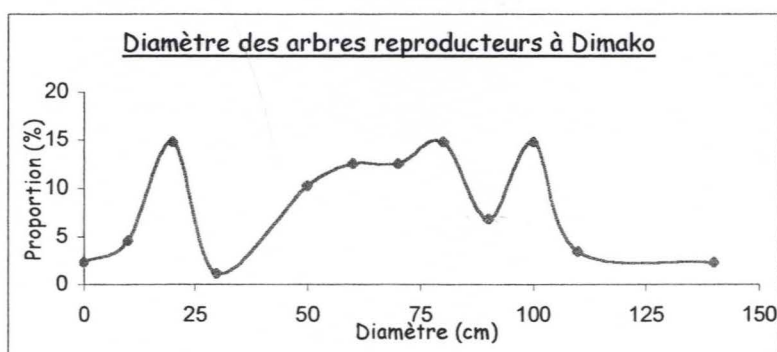
Figures 5a et 5b : Visualisation des flux de pollen vers les semenciers, à Dimako (a), et Ndama (b).

Nous notons qu'une des régénérations de la parcelle de Ndama provient d'une autofécondation du semencier, ainsi que trois régénérations de Dimako, ce qui nous donne comme probabilité d'autofécondation 6% à Ndama et 4% à Dimako.

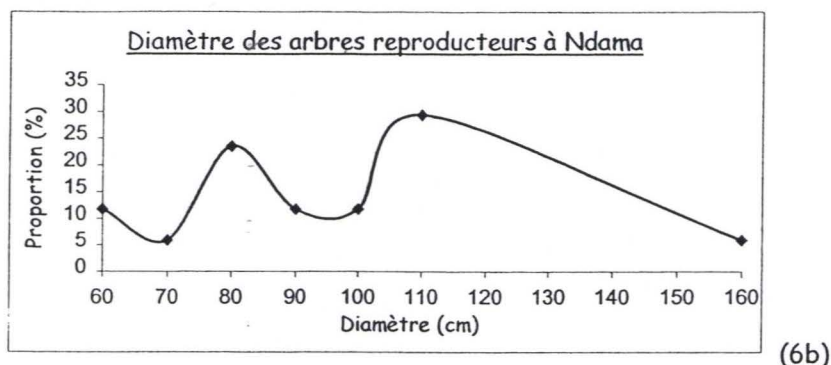
B - Diamètre des arbres reproducteurs

Une première constatation est que les jeunes adultes, c'est-à-dire les individus dont le diamètre est inférieur à 50 centimètres, produisent du pollen et participent à la fécondation. Dans ce sens, un individu d'un diamètre de 30 cm qui présentait une fructification a été récolté dans la parcelle de Dimako (Dubois, 1998).

Par ailleurs, nous remarquons que dans les deux parcelles, les arbres participant le plus à la reproduction, hormis les jeunes adultes, sont ceux de diamètre d'environ 80 cm et 110 cm. Ces valeurs ne correspondent pas aux pics d'effectif des individus dans la population totale, ce qui induirait donc une participation inégale des adultes à la reproduction.



(6a)



Figures 6a et 6b bis : Diamètre des arbres reconnus reproducteurs, à Dimako (a) et Ndama (b).

D'une part, d'après les génotypes observés, nous pouvions penser que certains plantules n'étaient pas issus du semencier. Mais ceci peut avoir diverses origines, hormis la dispersion des graines, telles que des ségrégations anormales ou encore des mutations sur les locus microsatellites lors de la formation des gamètes. En effet, les locus microsatellites utilisés étant constitués d'une répétition de deux bases, il est envisageable que sur un échantillon, il y ait des mutations lors de la réplication, mais ceci reste très incertain. Ainsi, il y a 13 régénérations à Dimako qui ne sont pas issues de l'adulte 20 ce qui représente 15% du total des régénérations.

D'autre part, le logiciel que nous avons utilisé, Cervus, a été créé pour l'étude de parenté des cerfs ce qui implique certains inconvénients. En effet, le logiciel base en partie sa recherche sur les fréquences alléliques des parents. Or, celles-ci sont calculées en prenant en compte tous les individus, c'est-à-dire parents et descendants. Le fait est que pour les espèces végétales les conditions de reproduction ne sont pas les mêmes que pour les cerfs, par conséquent, il aurait fallu utiliser seulement les génotypes des parents probables et non tous. De plus, le chevauchement des générations n'est pas du même ordre entre les végétaux et les animaux, du fait de leurs longévités différentes, et ceci n'est pas pris en compte par logiciel.

Enfin, certaines données ne sont pas prises en compte. Par exemple, des arbres qui sont morts aujourd'hui ont pu polliniser le semencier et donc on ne les retrouve pas parmi les parents potentiels.

Néanmoins, les résultats obtenus restent exploitables. Par exemple, ils nous permettent de dire que les arbres dont le diamètre se situe entre 20 et 50 cm participent à la reproduction donc ils produisent du pollen. En effet, à Dimako, les jeunes adultes représentent 20% des pères probables. On peut prendre en compte le fait que les jeunes adultes ont été génotypés en même temps que les régénérations, mais ils représentent 41 % de la population totale ce qui signifie que leur poids en tant que parents probables n'est pas surestimé.

2 - DIVERSITE GENETIQUE

Les amorces que nous avons choisies étaient les plus polymorphes ce qui se vérifie puisqu'on obtient des nombres d'allèles par locus relativement élevés (jusqu'à 29 pour le locus 244). Ceci est d'autant plus important que les individus sont des régénérations donc issus d'arbres identiques. En comparaison, chez certains arbres tropicaux, on trouve 1 à 15 allèles pour *Pithecellobium elegans* (Chase et al., 1996a) et de 13 à 22 pour *Symphonia globulifera* (Aldrich et al., 1998).

Le déficit en hétérozygotes observé chez les jeunes adultes peut avoir plusieurs origines. La première est due à la présence d'allèles nuls. En effet, des mutations ponctuelles peuvent intervenir au niveau des sites d'hybridation avec les amorces PCR et empêcher l'amplification des amorces microsatellites (Grivet et Noyer, 1999). Si ces mutations ne portent que sur un seul chromosome, la lecture ne montre que des homozygotes et donc le nombre d'hétérozygotes en est réduit (Jarne et Lagoda, 1996; Schlötterer, 1998).

D'autres raisons sont liées à la biologie de l'espèce :

- F. Garcia fait état de l'autofécondation possible qui accroît le taux de consanguinité. Mais d'après l'étude de paternité que nous avons réalisée, elle ne représente que 6% des régénérations à Dimako ce qui reste très faible comme c'est le cas pour de nombreuses espèces tropicales.
- On peut avancer le fait que tous les arbres ne participent pas à la reproduction. Or, comme nous le voyons avec la recherche de paternité, les jeunes adultes participent à la reproduction ce qui implique que la plupart des arbres entre 20 et plus de 100 cm de diamètre participe au renouvellement de la population.
- Une hypothèse assez probable serait l'homogamie positive. En effet, ce phénomène favorise la reproduction entre les arbres dont la floraison est plus courte comparée à la période totale (de novembre à avril pour le sapelli). Les plantes qui fleurissent tôt dans la saison sont donc préférentiellement pollinisées par d'autres arbres précoces et inversement (Hartl, 1994).
- la dissémination des graines peut jouer un rôle important dans le déficit en hétérozygotes. En effet, les croisements parents-enfants et entre frères et demi-frères peuvent être favorisés. Mais, lors du calcul des distances de pollinisation, nous avons vu que celles-ci étaient très importantes ce qui montrerait plutôt une diversité élevée due à des croisements entre individus éloignés génétiquement.

En ce qui concerne les régénérations, plusieurs points sont à retenir. En premier lieu, l'influence de l'exploitation sur le taux de régénérations est indéniable puisque le nombre de régénérations récupérées à Ndama est de 17 individus répartis sur quatre semenciers alors que sur la parcelle de Dimako, ce nombre s'élève à 86 individus pour un seul semencier. De plus, ceci est inversement proportionnel à la densité des arbres adultes (quatre fois plus élevée à Ndama qu'à Dimako). On peut expliquer ce phénomène par le simple fait de la densité de population dans la forêt, toutes essences confondues, puisque celle-ci est plus importante à Ndama. En effet, la pollinisation et la dissémination des graines sont gênées par les autres essences présentes sur la parcelle.

Conclusion

Les résultats obtenus lors de cette étude sont à relativiser spécialement ceux concernant la comparaison de la diversité génétique entre les régénérations de Dimako et celles de Ndama. Il est difficile de comparer un échantillon de 86 individus à un de 17. Mais ce point constitue en lui-même une indication très importante vis à vis de l'influence que peut avoir l'exploitation. En effet, nous n'avons récolté que 17 régénérations à Ndama car il n'y en avait pas d'autres à ce moment là. Par conséquent, on peut émettre quelques hypothèses quant au faible taux de régénérations en forêt non-exploitée :

- dans un premier temps, nous pouvons évoquer le caractère héliophile des plantules. En effet, l'exploitation permettrait de faire des trouées dans le couvert et ainsi favoriser le développement des régénérations. Alors qu'à Ndama, la densité des arbres empêcherait un éclaircissement suffisant.

- dans un deuxième temps, on peut penser qu'à Ndama, il y a un plus fort taux de plantes qui se font manger par divers animaux sauvages. Ils seraient plus nombreux qu'à Dimako du fait du caractère plus anthropique de cette dernière.

- enfin, la dispersion du pollen et des graines est plus difficile à Ndama à cause de la densité de population. D'où un nombre d'auto-fécondation qui serait plus important. Ceci provoquerait une mortalité plus grande due à la sélection.

Il serait donc utile de suivre les régénérations de Ndama pendant une période importante pour définir les causes de ce faible taux de régénérations. On pourrait par exemple observer la période de la dissémination des graines jusqu'à l'arrivée des plantules à un stade mature.

Nous avons également pu constater que trois amorces suffisent à caractériser toutes les régénérations ce qui est très encourageant.

Et enfin, il faut noter que la recherche de paternité nous permet de distinguer quasiment tous les pères des régénérations avec des probabilités fortes ce qui montre le polymorphisme élevé des microsatellites. Les résultats concernant les distances de pollinisation et l'identification des arbres réellement reproducteurs en fonction de leur diamètre sont donc à prendre en compte dans les études futures.

Conclusion

L'utilisation de marqueurs microsatellites sur le sapelli est très récente. Ils se sont révélés hyper variables et ont permis de caractériser la diversité génétique de cette espèce dans la forêt communale de Dimako et dans l'U.F.A. 10-038, proche de la rivière Ndama au sud-est du Cameroun.

Le polymorphisme des microsatellites est très important puisque le nombre d'allèles par locus est élevé et indique une variabilité génotypique importante. Ils permettent l'identification de plus de 96% des individus.

Leur utilisation dans la recherche de paternité permet d'identifier tous les parents avec des probabilités d'exclusion allant jusqu'à plus de 99%.

La richesse des forêts tropicales est élevée mais la densité des essences est assez faible. Les études génétiques sont essentielles dans l'interprétation de la dynamique de ces populations naturelles. Les espèces ligneuses de forêt dense tropicale plurispécifique sont caractérisées pour la plupart à la fois par la faiblesse de leurs effectifs et par la longévité des individus et de leur période reproductive. De nombreuses espèces caractéristiques de la canopée présentent, dans les jeunes stades, un caractère héliophile plus ou moins marqué et le renouvellement des effectifs se fait généralement à l'occasion des ouvertures du couvert. Chez de telles espèces, la disparition des individus adultes a deux conséquences en apparence contradictoires :

- elle provoque une diminution du nombre de semenciers présents, donc entre autres une diminution du nombre de graines mises dans le milieu ;
- elle provoque l'ouverture des peuplements donc une diminution considérable de la mortalité chez les régénérations à tous les stades.

Dans cette étude, il a été difficile de réellement analyser l'influence de l'exploitation forestière au niveau de la diversité génétique. Il en ressort tout de même que le caractère héliophile des plantules est très important. Ainsi, il semblerait que l'exploitation ait favorisé la régénération naturelle du sapelli grâce à un élagage du couvert. Néanmoins, une exploitation à grande échelle et désordonnée, comme c'est le cas aujourd'hui au Cameroun, pourrait mettre en péril non seulement la viabilité de l'espèce, par l'isolement de populations, mais aussi l'économie de certains pays qui dépend en partie de l'exploitation du bois. Les activités humaines entraînant la fragmentation des populations ont un impact négatif sur l'ensemble des organismes qui interagissent avec les espèces exploitées.

La conservation *in situ* semble une alternative inévitable si nous voulons protéger la biodiversité mais elle doit tenir compte des processus dynamiques des espèces et le plus souvent avoir une large superficie.

L'étude que nous avons réalisée, en complément de celle réalisée par F. Garcia, doit servir de base pour effectuer des recherches plus approfondies sur le sapelli. En effet, si le but recherché est la conservation de la biodiversité, il semble nécessaire de réaliser les études de diversité génétique sur l'ensemble de l'aire de répartition du sapelli ou au moins dans l'ensemble du Cameroun. Ceci pourrait permettre d'étudier l'évolution de la ressource génétique forestière et de contribuer à la mise en place d'une gestion raisonnée de l'espèce dans ces forêts.

Bibliographie

- Aldrich, P.R., Hamrick, J.L., Chavarriaga, P., Kochert, G., 1998. Microsatellite analysis of demographic genetic structure in fragmented populations of the tropical tree *Symphonia globulifera*. *Molecular Ecology*, 7:933-944.
- Aubréville, A., 1959. La flore forestière de la Côte d'Ivoire. Tome deuxième, 2e édition révisée, Centre Technique Forestier Tropical, 343 p..
- Bois et Forêt des Tropiques, n°175, septembre-octobre 1977. Commerce des Bois Tropicaux, exportations des bois des pays tropicaux, Nigéria, p.63.
- Chase, M.R., Moller, C., Kesseli, R., Bawa, K.S., 1996. Distant gene flow in tropical trees. *Nature*, 383:398-399.
- Chevallier, M-H, 1998. Les marqueurs moléculaires. *In Vers une approche régionale des ressources génétiques forestières en Afrique sub-saharienne*, pp. 130-137. Ed. AS Ouédraogo et JM Boffa.
- Dubois, C., 1998. Impact de l'exploitation forestière sur la reproduction et les flux polliniques d'*Entandrophragma cylindricum* en forêt dense semi-décidue du Cameroun. Compte-rendu première phase de terrain. CIRAD-Forêt, juillet-octobre 1998, 9 p. + annexes.
- Durrieu de Madron, L., Forni, E., 1997. Aménagement forestier dans l'est du Cameroun, structure du peuplement et périodicité d'exploitation. *Bois et Forêts des tropiques*, 254 (4):39-50.
- Engels, J., 1998. Introduction. *In Vers une approche régionale des ressources génétiques forestières en Afrique sub-saharienne*, p. 1. Ed. AS Ouédraogo et JM Boffa.
- Forni, E., 1995. Plan d'aménagement de la forêt communale de Dimako. République du Cameroun, Ministère de l'Environnement et des Forêts, Direction des Forêts, Projet API Dimako, 1995, 65 p.+ annexes.
- Garcia, F., 2000. Gestion *in situ* des ressources génétiques de *Entandrophragma cylindricum* (Sprague) Sprague en forêt tropicale humide : évaluation de la diversité des arbres reproducteurs à l'aide de marqueurs microsatellites. Mémoire de DESS, Univ. Pierre et Marie Curie, Paris 6, 31p. + annexes.
- Grivet, L., Noyer, J.L., 1999. Les méthodes de marquage biochimique et moléculaire. *In Diversité génétique des plantes tropicales cultivées*, Hamon P, Seguin M, Perrier X, Glaszmann JC. Repères, éd. Scientifiques CIRAD, 1999, 387 p.
- Hartl, D.L., 1994. Génétique des populations. Médecin-Sciences Flammarion, traduit de l'américain par Borot N, 305 p..
- Hardy, O.J., Vekemans, X., 1999. Isolation by distance in a continuous population : reconciliation between spatial autocorrelation analysis and population genetics models. *Heredity*, 83,145-154.

Isagi, Y., Kanazashi, T., Suzuki, W., Tanaka, H., Abe, T., 2000. Microsatellite analysis of the regeneration process of *Magnolia obovata* Thunb.. *Heredity*, 84, 143-151.

IUCN (Union mondiale pour la nature), 1996. L'atlas pour la conservation des forêts tropicales d'Afrique. Ed. Jean-Pierre De Monza, 310 p..

Jarne, P., Lagoda, P.J.L., 1996. Microsatellites, from molecules to populations and back. *Tree*, vol. 11, 10, 424-429.

Karsenty, A., 1999. Le Cameroun et l'exportation des grumes. *Bois et Forêts des Tropiques*, (262) 4:94-95.

Karsenty, A., avril 2000. Aide-Mémoire, mission d'appui du 25 mars au 9 avril 2000 sur les aspects sociaux du classement Projet "Forêts et Terroirs", CIRAD-Forêt. République du Cameroun, Ministère de l'Environnement et des Forêts, Projet "Forêts et Terroirs", 12p..

Letouzey, R., 1968. Etude phytogéographique du Cameroun. *Encyclopédie Biologique-LXIX*, éd. P. Lechevalier-Paris, 511p..

Marshall, T.C., Slate, J., Kruuk, L.E.B., Pemberton, J.M., 1998. Statistical confidence for likelihood-based paternity inference in natural populations. *Molecular Ecology*, 7:639-655.

Mbarga A. Manga, 2000. Caractérisation de la regeneration naturelle du sapelli (*Entandrophragma cylindricum* Sprague) dans la forêt de Dimako. Diplôme d'ingénieur des Eaux, Forêts et Chasses, Univ. de Dschang, faculté d'agronomie et des sciences agricoles, 86p. + annexes.

Moynot, G., 2000. Organisation spatiale de la diversité génétique d'une espèce forestière camerounaise, le sapelli (*Entandrophragma cylindricum* SPRAGUE). Diplôme d'ingénieur agronomique, I.N.A. Paris-Grignon, 22p. + annexes.

Nason, J.D., Aldrich, P.R., Hamrick, J.L., 1997. Dispersal and the Dynamics of Genetic Structure in Fragmented Tropical Tree Populations. In *Tropical Forest Remnants, Ecology, Management, and Conservation of Fragmented Communities, paper* (eds Laurance WF and Bierregaard RO Jr), pp. 304-320, University of Chicago Press, Chicago; London.

Nason, J.D., Herre, E.A., Hamrick, J.L., 1998. The breeding structure of a tropical keystone plant resource. *Nature*, 391:685-687.

Petrucci, Y., Tandeau de Marsac, G., 1994. Dispositif de recherche en forêt dense de Boukoko-La Lolé - Campagne 1993. Evolution du peuplement adulte et de la régénération acquise après interventions sylvicoles. Rapport interne du Projet "Appui à la recherche forestière", Ministère des Eaux, Forêts, Chasse et Pêches de la République Centrafricaine. 51 p. + ann.

Projet API-Dimako, 1995a. Plan d'aménagement de l'U.F.A. 10-046. République du Cameroun, Ministère de l'Environnement et des Forêts, Direction des Forêts, document provisoire, décembre 1995. 77 p..

Projet API-Dimako, 1995b. Plan d'aménagement de l'U.F.A. 10-038. République du Cameroun, Ministère de l'Environnement et des Forêts, Direction des Forêts, document provisoire, décembre 1995. 90 p..

Sans nom, 1974. Sapelli. Bois et Forêts des Tropiques, 154:27-40.

Schlötterer, C., 1998. Microsatellites. In Molecular genetic, Analysis of populations a practical approach, second edition, Hoelzel AR, IRL Press, 1998, 441 p..

Staner, P., Gilbert, G., 1958. Meliaceae. In Flore du Congo Belge et du Ruanda-Urundi-Spermatophytes, volume VII, INEAC, 1958, 368 p..

Streiff, R., 1998. Structure génétique spatiale et flux polliniques dans une chênaie mixte: *Quercus petraea* (Matt.) Liebl., *Quercus robur* L.. Thèse Univ. Montpellier II, 97 p. + annexes.

Streiff, R., Labbe, T., Bacilieri, R., Steinkellner, H., Glössl, J., Kremer, A., 1998. Within-population genetic structure in *Quercus robur* L. and *Quercus petraea* (Matt.) Liebl. assessed with isozymes and microsatellites. Molecular Ecology, 7, 317-328.

Streiff, R., Ducouso, A., Lexer, C., Steinkellner, H., Gloessl, J., Kremer, A. 1999. Pollen dispersal inferred from paternity analysis in a mixed oak stand of *Quercus robur* L. and *Q. petraea* (Matt.) Liebl.. Molecular Ecology, 8, 831-841.

Voorhoeve, A.G., 1965. Liberian high forest trees, Centre for Agricultural Publications and Documentation , 416 p..

Whitmore, T.C., 1997. Tropical Forest Disturbance, Disappearance, and Species Loss. In Tropical Forest Remnants, Ecology, Management, and Conservation of Fragmented Communities, paper (eds. Laurance WF, Bierregaard RO Jr), pp. 3-12. University of Chicago Press, Chicago; London.

Zongo, J-D, 1998. Organisation de la diversité génétique dans les populations naturelles. In Vers une approche régionale des ressources génétiques forestières en Afrique sub-saharienne, pp. 114-123. Ed. AS Ouédraogo et JM Boffa.

Annexes

ANNEXE 1

Les forêts de Dimako et Ndama au Cameroun

Cameroun



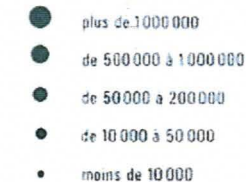
RELIEF

ALTITUDES en mètres



VILLES

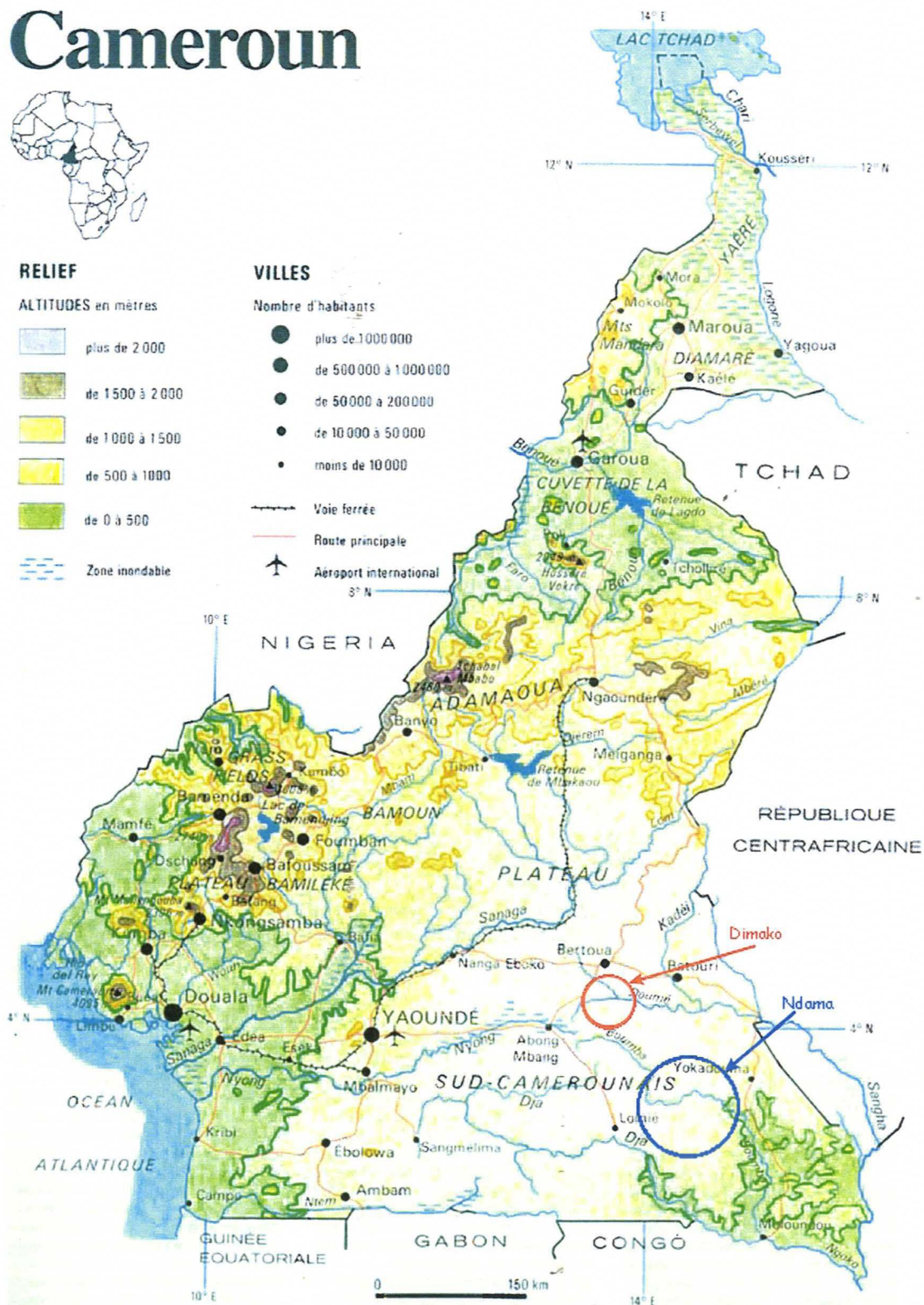
Nombre d'habitants



Voie ferrée

Route principale

Aéroport international



ANNEXE 2

Extraction ADN

- Broyer 50 mg (ou 80 suivant la quantité initiale de feuille sèche) au mortier dans N₂ liquide
- Transférer dans un tube de 15 ml
- Ajouter 5 ml de tampon d'extraction, préchauffé à 74 °C
- Ajouter 15 µl de RNase T1: 25mg/ml 2Ou/ng (facultatif) ou 8,52 µl pour RNase à 0,88 u/µl
- Vortexer 10 secondes
- Incuber 20 mn à 74 °C, agiter légèrement de temps en temps
- Refroidir à température ambiante, ajouter 5 ml de CIAA, agiter par retournement (~100 fois)
- Centrifuger 15 mn à 9000 g
- Transférer la phase aqueuse dans de nouveaux tubes de 15 ml
- Ajouter 5 ml d'isopropanol
- Centrifuger 5 mn à 3000g
- Sécher quelques minutes au speedvac à température médium
- Reprendre le culot dans 100 µl d'eau stérile
- Transférer dans des tubes ependorf de 1,5 ml

Tampon d'extraction

Pour 500 ml :

Concentration Finale

- 100mM Tris-cl, pH 8,0	(50 ml, 1M)
- 1,4 M NaCl	(140 ml, 5M)
- 20 mM EDTA	(20 ml, 500mM)
- 2% MATAR	(10 gr)
- 1% PEG 6000	(5 gr)
- 0,5% sulfite de sodium	(2,5 gr)

ANNEXE 3

EXTRACTION D'ADN

méthode mini kit QIAGEN

- Allumer le bain-marie à 65°C
- Mettre le tampon AP1 à 65°C s'il y a des cristaux

LYSE DES CELLULES

- Peser 50 mg à 80 mg de matière sèche
- Couper les échantillons en petits morceaux (à la main) et les mettre dans des mortiers (ajouter une pointe de spatule de sable de Fontainebleau)
- Ajouter de l'azote liquide et broyer en fine poudre. Ne pas laisser les échantillons se décongeler
- Quand l'azote est évaporé, ajouter 400 µl de tampon AP1 (voire 800 µl si c'est trop pâteux)
- Transférer dans un microtube de 1,5 ml
- Ajouter 4 µl de RNase à 100 mg/ml (31,8 µl de RNase à 0,88 u/µl)
- Vortexer vigoureusement
- Laisser incubé 10 mn à 65°C (bain-marie). Mélanger 2 ou 3 fois par inversion

PRECIPITATION DES PROTEINES, POLYSACCHARIDES ET DETERGENT

- Ajouter 130 µl de tampon AP2
- Mélanger au vortex
- Incuber 5 mn dans la glace

ELIMINATION DES DEBRIS ET PRECIPITES

- Centrifuger 5 mn à vitesse maximale
- Verser le surnageant dans une colonne violette
- Centrifuger 2 mn à vitesse maximale
- Transférer le filtrat dans un tube de 1,5 ml (non fourni) à la pipette. Estimer le volume recueilli

AJUSTEMENT DES CONDITIONS

- Ajouter 0,5 volume de tampon AP3 et 1 volume d'éthanol 100%
- Mélanger par aspirations-refoulements à la pipette

SEPARATION SUR RESINE ECHANGEUSE D'ANIONS

- Déposer un volume d'échantillons de 650 µl maximum sur une colonne blanche
- Centrifuger à vitesse ≥ 6000 g
- Eliminer le liquide du tube
- Si l'échantillon a un volume >650 µl, repasser le restant sur la même colonne blanche
- Placer les colonnes sur de nouveaux tubes de 2 ml fournis (jeter les anciens)

LAVAGE

- Mettre 500 μ l de tampon AW sur chaque colonne
- Centrifuger 1 mn à vitesse ≥ 6000 g
- Eliminer le liquide du tube, puis y replacer la colonne
- Remettre 500 μ l de tampon AW sur chaque colonne
- Centrifuger 2 mn à vitesse maximale, la colonne doit sécher
- Retirer précautionneusement les colonnes des tubes sans que les membranes ne touchent le liquide, les placer sur des tubes de 1,5 ml

ELUTION

- Ajouter 100 μ l de tampon AE à 65°C sur chaque colonne
- Laisser au minimum 5 mn à 65°C au bain-marie (attention à ce que des gouttes ne tombent pas sur les capuchons)
- Centrifuger 1 mn à vitesse ≥ 6000 g
- Récupérer l'éluat et s'en servir pour une seconde élution

Conserver la solution ainsi réalisée à 4°C (quelques jours) ou à -20°C (si plus longtemps) en attendant le dosage.

Matériel

matériel fourni par le kit, plus :

- grands mortiers + pilons
- bouteille thermos
- portoirs pour microtubes
- microtubes stériles de 1,5 ml
- micropipette P1000
- micropipette P200
- micropipette P10
- papier absorbant
- cônes stériles P200, P1000
- bain-marie agité
- centrifugeuse

ANNEXE 4

Migration sur gel d'agarose

PREPARATION DE GRAND GEL A 1% (A 3%)

- Peser 2,2 g (6,6 g) d'agarose
- Ajouter 220 ml de TBE à 0,5X
- Faire chauffer deux à trois minutes pour dissoudre l'agarose
- Couler la solution dans un support grand gel en évitant les bulles
- Ajouter deux peignes de 30 dents
- Laisser refroidir de 30 mn à 1 h

PREPARATION DES ECHANTILLONS

- Prélever de 2 à 3 μ l d'échantillons suivant le but recherché
- Déposer le volume prélevé sur une plaque 96 puits
- Ajouter 5 μ l de bleu de charge
- Compléter à 12 μ l avec de l'eau stérile

DEPOT DES ECHANTILLONS

- Retirer les peignes du gel
- Immerger le gel dans 2 L de TBE 0,5X
- Avec une micropipette P20, prélever les 12 μ l d'échantillons
- Déposer les 12 μ l dans un puits
- Pour les gels de dosages mettre sur chaque peigne une gamme de référence (ADN de phage λ à 25, 50, 75, 100, 150 μ g/ μ l)
- Faire migrer de 1 h à 3 h suivant la concentration à 100 V

REVELATION DU GEL

- Placer le gel pendant 20 mn dans un bain de BET (bromure d'éthidium)
- Laver une dizaine de minutes à l'eau
- Révéler et photographier sous UV

ANNEXE 5

Polymerase Chain Reaction (PCR)

PREPARATION DE LA PCR

- Prendre une plaque 96 puits spécifique du thermocycleur à utiliser
- Déposer 2 μ l d'échantillons dans les puits
- Préparer le mélange réactionnel PCR avec par puits :

- 6,25 μ l de tampon 2X
- 0,05 μ l de chaque amorce (Reverse et Forward)
- 3,65 μ l d'eau stérile
- 0,1 μ l de Taq 5U/ μ l

(Ajouter la Taq au dernier moment et la conserver dans un bloc réfrigérant à -20°C)

- Ajouter le mélange réactionnel à chaque échantillon avec une pipette multidistribution
- Ajouter une goutte d'huile sur chaque puits pour éviter l'évaporation durant la PCR
- Mettre la plaque dans le thermocycleur
- Lancer le programme

PROGRAMME PCR POUR MICROSATELLITES-SAPELLI

Dénaturation	4 min	94°C	1 cycle
Dénaturation	30 secs	94°C	30 cycles
Hybridation	30 secs	température spécifique des amorces*	
Elongation	1 min	72°C	
Elongation	10 min	72°C	1 cycle

* la température spécifique de chaque amorce a été déterminée en 2000 par F. Garcia. Elles sont donc de : 54°C pour la 156, 56°C pour la 244 et la 271.

ANNEXE 6

Migration sur gel d'acrylamide, à 6%

PREPARATION DE LA SOLUTION STOCK D'ACRYLAMIDE

- Solution d'acrylamide 6%, dénaturante

produits	quantité	[finale]
Urée	210 g	7 M
Tampon TBE 10X	50 ml	1X
Acrylamide/bisacrylamide 19 :1	75 ml	6%
Eau milliQ	qsp 500 ml	

- Dissoudre l'urée dans ≈180 ml d'eau milliQ à chaud (50°C maximum)
- Ajouter le TBE et l'acrylamide
- Compléter à 500 ml avec l'eau milliQ
- Filtrer avec une membrane 2 µm
- Stocker dans une bouteille propre, à l'abri de la lumière.

PREPARATION DES PLAQUES

♦ pour un gel 40 cm	♦ pour un gel 50 cm
<p><u>plaque à oreilles</u> : REPEL SILANE</p> <ul style="list-style-type: none"> ➤ Imbiber un papier absorbant et appliquer avec, dans tous les sens ➤ Laisser sécher ➤ Essuyer avec un papier absorbant imbibé d'éthanol à 95%, dans tous les sens ➤ Recommencer 1 fois ces opérations 	
<p><u>grande plaque</u> : BIND SILANE</p> <ul style="list-style-type: none"> ➤ éthanol 95% : 2 ml ➤ eau pure : 2 ml ➤ acide acétique 100% : 100 µl ➤ bind silane : 10 µl 	<p><u>grande plaque</u> : BIND SILANE</p> <ul style="list-style-type: none"> ➤ éthanol 95% : 2,5 ml ➤ eau pure : 2,5 ml ➤ acide acétique 100% : 125 µl ➤ bind silane : 12,5 µl
<ul style="list-style-type: none"> ➤ Verser sur la plaque et appliquer avec un papier absorbant, dans tous les sens ➤ Laisser sécher ➤ Essuyer avec un papier absorbant imbibé d'éthanol à 95%, dans tous les sens ➤ Laisser sécher ➤ Répéter 3 fois le nettoyage à l'éthanol en laissant sécher entre chaque passage 	

PREPARATION DU GEL

♦ pour un gel 40 cm	♦ pour un gel 50 cm
-70 ml de solution d'acrylamide -240 μ l d'APS à 10% -100 μ l de TEMED	-87,5 ml de solution d'acrylamide -300 μ l d'APS à 10% -125 μ l de TEMED

POLYMERISATION

- Mettre un espaceur mouillé de chaque côté de la plaque sans oreille
- Poser la plaque à oreille sur l'autre et maintenir avec des pinces
- Couler le gel à l'aide d'une seringue entre les deux plaques
- Mettre une cale pour pouvoir mettre le peigne après polymérisation
- Laisser polymériser le gel environ 20 mn

MIGRATION

- Faire préchauffer le gel pendant 1 heure pour obtenir une température uniforme sur toute sa surface
- Placer un peigne sur le haut du gel
- Déposer 12 μ l de bleu dénaturant dans chaque puits de la plaque PCR
- Dénaturer 4 min à 94°C
- Déposer 5 μ l de solution d'ADN dans chacun des puits du peigne
- Placer à droite et à gauche des échantillons, des échelles (10 pb)
- Faire migrer au minimum 3 heures à 2100 V et 60 W

REVELATION AU NITRATE D'ARGENT DE GEL DE SEQUENCE D'ACRYLAMIDE

ETAPES	TEMPS	PREPARATION DES SOLUTIONS
acide acétique (bac gris)	30 minutes	-150 ml d'a. acétique 100% -qsp 1,5 l d'eau pure
4 rinçages à l'eau pure (bac blanc)	2 minutes par bain	-----
coloration (bac rouge)	30 minutes	-1,5 l d'eau pure -7,5 ml d'AgNO ₃ à 20% -2,25 ml de formaldéhyde à 37%
rinçage à l'eau pure (bac blanc)	5 secondes	-----
révélation (bac blanc)	Jusqu'à coloration souhaitée	-45 g de NaCO ₃ -1,5 l d'eau pure -2,25 ml de formaldéhyde à 37% -150 µl de thiosulfate de Na à 10mg/ml
fixation (bac gris)	15 minutes	solution d'acide acétique 10% du départ
rinçage à l'eau pure (bac blanc)	10 minutes	-----

ANNEXE 7

Fréquences alléliques des régénérations

Allèles	Locus 156		Allèles	Locus 244		Allèles	Locus 271	
	Dimako	Ndama		Dimako	Ndama		Dimako	Ndama
176	0,006		206	0,0058		111		
177			209	0,0058		114	0,0529	0,0588
178	0,0301		210			116		
179			212			118	0,2941	0,0588
180	0,3072		224	0,0058		120	0,0118	
181			226	0,0058		121	0,2824	
182	0,0301	0,1176	232	0,0174		122		
183			236		0,0294	123		0,0294
184	0,1084	0,2647	240	0,0174		124	0,0353	
186	0,0181	0,0588	242			125		
188	0,012		244	0,0174	0,0588	128		
189			246	0,0058		129	0,0176	
190	0,0542		248	0,0407	0,0588	130	0,0059	0,0882
191			249	0,0116		131	0,0059	
192	0,012		250	0,0291		132		0,1471
194	0,0482	0,0588	252	0,0581	0,1176	133	0,0118	0,0294
195			254	0,0233		134	0,0118	0,0294
196	0,2289	0,1471	256	0,0174		135	0,0059	
197			258	0,064	0,1176	136	0,0059	
198	0,0422	0,0294	260	0,0291	0,0882	137	0,0647	0,0294
200	0,0301		261	0,0116		138	0,0353	0,0882
201			262	0,0465	0,0588	139	0,0412	
202	0,0301	0,0294	263	0,0058		140	0,0412	0,0588
204	0,012	0,2353	264	0,0174	0,0588	141	0,0059	0,3235
205			266	0,3256	0,2353	142	0,0059	
206	0,006	0,0588	268	0,0058	0,0882	143	0,0118	0,0588
208	0,0241		270	0,0058	0,0588	144	0,0353	
			272	0,0058	0,0294	149	0,0059	
			274	0,0058		153	0,0118	
			275	0,0058				
			276					
			280	0,0174				
			282					
			284	0,1919				
			290					
			292					

0,006
0,2353

Allèle rare
Allèle majoritaire

f<1%
f>20%

ANNEXE 8

Fréquences alléliques des jeunes adultes

Allèle	Locus 156	Allèle	Locus 244	Allèle	Locus 271
176	0,0278	206		111	0,0119
177	0,0417	209		114	0,0119
178	0,0139	210	0,0119	116	0,0119
179	0,0278	212	0,0357	118	0,25
180	0,0833	224		120	
181	0,0556	226		121	0,0595
182	0,0278	232		122	0,0119
183	0,1389	236	0,0119	123	0,0238
184	0,0278	240	0,0238	124	0,0119
186		242	0,0119	125	0,0238
188		244	0,1429	128	0,0833
189	0,0833	246	0,0714	129	
190	0,0278	248	0,0119	130	0,0833
191	0,0139	249		131	0,0357
192	0,0417	250	0,0595	132	
194		252	0,0714	133	0,0714
195	0,0556	254	0,0238	134	
196		256	0,0119	135	0,0119
197	0,1667	258	0,0714	136	0,0238
198		260	0,0476	137	
200	0,0278	261	0,0238	138	0,119
201	0,0556	262	0,1071	139	0,0476
202		263		140	0,0476
204	0,0417	264	0,0476	141	
205	0,0417	266	0,0119	142	0,0476
206		268		143	0,0119
208		270		144	
		272	0,0119	149	
		274	0,1071	153	
		275			
		276	0,0238		
		280			
		282	0,0119		
		284	0,0119		
		290	0,0238		
		292	0,0119		

0,006

0,25

Allèle rare

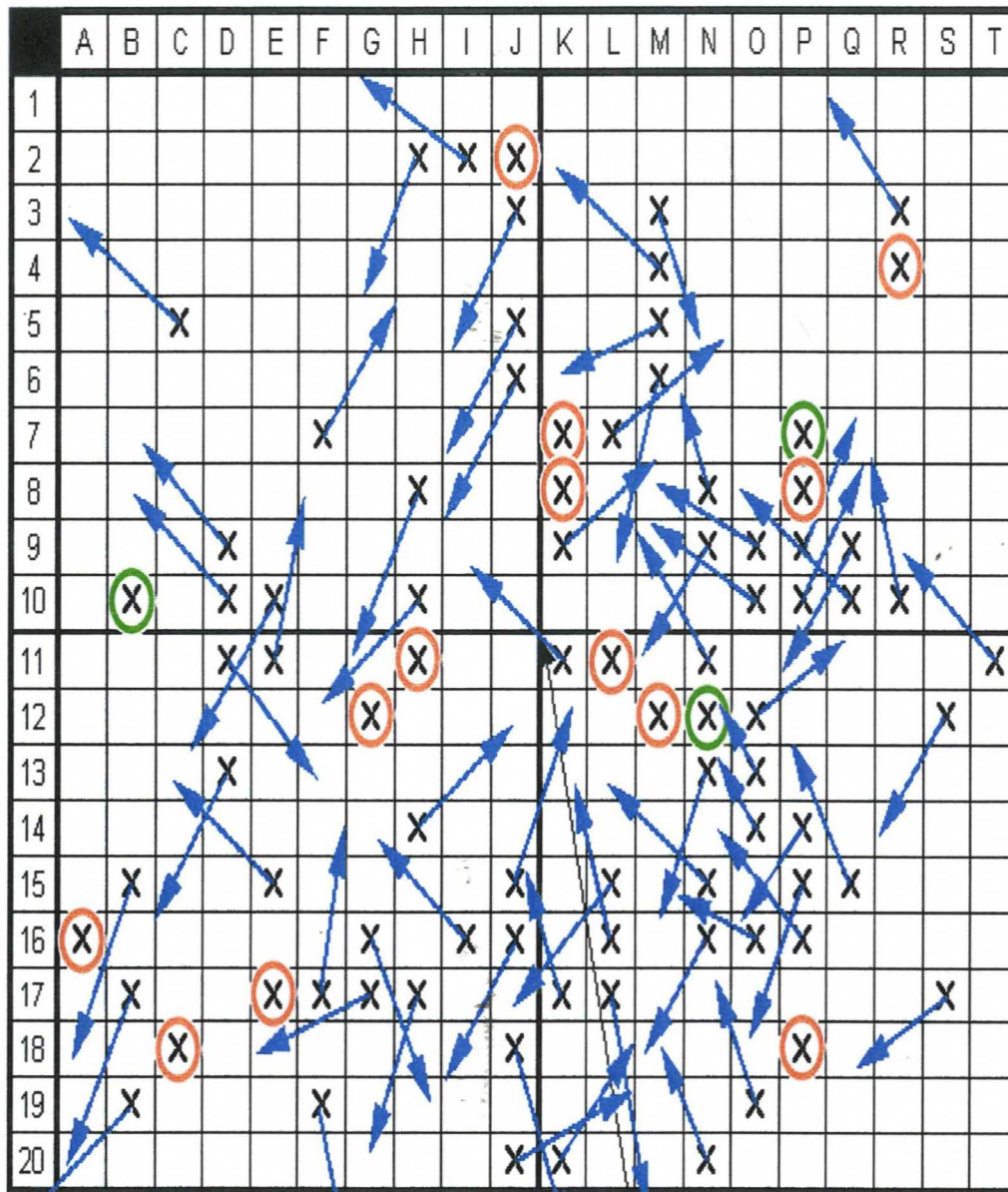
Allèle majoritaire

f<1%

f>20%

ANNEXE 9

Direction des pollinisateurs en fonction de la position des régénérations



X Régénérations
 Semencier
 O Graines issues d'auto-fécondation
 O Graines non issues du semencier
 → Direction des pollinisateurs